



(51) Internationale Patentklassifikation 6 :  B01L 7/00, C12Q 1/68		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/41015  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 19. August 1999 (19.08.99)
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/01014</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 10. Februar 1999 (10.02.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 05 350.9 11. Februar 1998 (11.02.98) DE</p> <p>(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten außer US</i>): INSTITUT FÜR PHYSIKALISCHE HOCHTECHNOLOGIE E.V. [DE/DE]; Helmholtzweg 4, D-07743 Jena (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): KÖHLER, Johann, Michael [DE/DE]; Untergasse 8, D-07751 Golmsdorf (DE). MOKANSKY, Andreas [DE/DE]; Schufussstrasse 32, D-01277 Dresden (DE). POSER, Siegfried [DE/DE]; Schlippenstrasse 19, D-07749 Jena (DE). SCHULZ, Torsten [DE/DE]; Nollendorfer Strasse 11, D-07743 Jena (DE).</p> <p>(74) Anwalt: PFEIFFER, Rolf-Gerd; Pfeiffer &amp; Partner, Helmholtzweg 4, D-07743 Jena (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	
<p>(54) Titel: MINIATURIZED TEMPERATURE-ZONE FLOW REACTOR</p> <p>(54) Bezeichnung: MINIATURISIERTER TEMPERATURZONEN FLUSSREAKTOR</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to a miniaturized temperature-zone flow reactor, used for thermally controlled biochemical or molecular-biology processes, especially the PCR method. The invention aims to provide a temperature-zone flow reactor which allows for more effective reactions. To this end at least one closed flow path is provided which is divided into three partial paths (A1...An; B1...Bn and BB1...BBn-1; C1...Cn) in such a way that three substrate platelets (A; B; C) consisting of a material whose heat conductivity is as high as possible are provided, which have defined channel sections which are at a distance to each other and connected by a connecting chip (V) consisting of a poorly heat-conductive material. The substrate platelets (A; B; C) are maintained at different temperatures by suitable means.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft einen miniaturisierten Temperaturzonen Flußreaktor, der bei thermisch zu kontrollierenden, biochemischen bzw. molekularbiologischen Prozessen, insbesondere beim Verfahren der PCR, Anwendung findet. Die Aufgabe der Erfindung, einen solchen Temperaturzonen Flußreaktor anzugeben, der eine effektivere Reaktion durchzuführen erlaubt, wird dadurch gelöst, daß wenigstens ein geschlossener Durchflußweg vorgesehen ist, der in drei Teilwege (A1...An; B1...Bn und BB1...BBn-1; C1...Cn) derart unterteilt ist, daß drei Substratplättchen (A; B; C), bestehend aus einem Material mit einer möglichst hohen Wärmeleitfähigkeit, vorgesehen sind, die definierte Grabenabschnitte beinhalten, welche voneinander beabstandet über ein Verbindungschip (V), bestehend aus einem schlecht wärmeleitfähigen Material, miteinander verbunden sind, wobei die Substratplättchen (A; B; C) durch geeignete Mittel auf unterschiedlichen Temperaturen gehalten werden.</p>			

***LEDIGLICH ZUR INFORMATION***

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## Miniaturisierter Temperaturzonen Flußreaktor

### Beschreibung

5 Die Erfindung betrifft einen miniaturisierten Temperaturzonen Flußreaktor, der bei thermisch zu kontrollierenden, biochemischen bzw. molekularbiologischen Prozessen, insbesondere beim Verfahren der sogenannten Polymerase-Ketten-Reaktion, im weiteren mit PCR bezeichnet, bei dem aus einem Gemisch von DNA-Sequenzen bestimmte 10 Sequenzen vervielfacht werden, Anwendung findet.

Bei der Durchführung von thermisch kontrollierten, biochemischen bzw. molekularbiologischen Prozessen sind häufig Prozeßschritte mit unterschiedlicher Temperaturbeaufschlagung erforderlich. Von besonderer 15 Bedeutung sind solche wechselnden Temperaturbeaufschlagungen bei der sogenannten PCR.

Das Verfahren der PCR ist in den letzten Jahren zur Vervielfachung bestimmter DNA-Sequenzen entwickelt worden und in seinen Grundsätzen von Darnell, J.; Lodish, H.; Baltimore, D. in "Molekulare Zellbiologie", Walter de Gruyter, Berlin-New York 1994, S. 256/257" 20 ausgeführt. Unter anderem ist bei diesem Verfahren wesentlich, daß Gemische aus DNA-Sequenzen einer definierten Temperaturwechselbehandlung unterworfen werden. Dazu finden stationäre Probenbehandlungsapparaturen Verwendung, bei denen die entsprechenden Proben in Probenkammern eingegeben und periodisch einem Warm-Kalt- 25 Temperaturzyklus unterworfen werden, wobei sich je nach definiert vorgegebenen Primern die jeweils gewünschten DNA-Sequenzen vervielfachen. Die Effektivität bislang bekannter Probenkammern wird dabei als nicht ausreichend angesehen. Aus diesem Grund ist in jüngster Zeit eine 30 miniaturisierte Probenkammer vorgeschlagen worden (Northrup et al, DNA Amplification with Microfabricated reaction chamber, 7th International Conference on Solid State Sensors and Actuators, Proc. Transducers 1993, S. 924-26), die eine vierfach schnellere Vervielfachung gewünschter DNA-Sequenzen gegenüber bekannten Anordnungen ermöglicht. Diese bis zu 50 µl Probenflüssigkeit aufnehmende 35 Probenkammer besteht aus einer strukturierten Siliziumzelle mit einer

Längsausdehnung in der Größenordnung von 10 mm, welche in einer Probenangriffsrichtung von einer dünnen Membran abgeschlossen ist, über die die entsprechende Temperaturbeaufschlagung mittels miniaturisierter Heizelemente erfolgt. Auch bei dieser Vorrichtung wird die zu vervielfachende DNA-Sequenz über Mikrokanäle in die Kammer eingebracht, einer Polymerase-Ketten-Reaktion unterworfen und anschließend wieder abgezogen. Trotz der mit dieser Vorrichtung erzielten Vorteile haftet ihr im wesentlichen der Nachteil an, daß auch diese Probenkammer als Ganzes beheizt und gekühlt werden muß, womit sich nur begrenzte Temperaturwechselraten erreichen lassen. Insbesondere bei weiterer Reduzierung der Probengröße fällt dabei die parasitäre Wärmekapazität der Probenkammer und ggf. eines notwendigen Temperierblocks gegenüber der Probenflüssigkeit immer stärker ins Gewicht, so daß die prinzipiell bei kleinen Flüssigkeitsvolumina denkbaren hohen Temperaturwechselraten nicht erreicht werden können, wodurch die Effektivität des Verfahrens relativ gering bleibt. Darüber hinaus ist zwecks Erreichung jeweils konstanter Temperaturregimes für die Probenflüssigkeit ein relativ aufwendiger Steuer- und Regelaufwand erforderlich, wobei die erbrachte Heiz- bzw. Kühlleistung im wesentlichen nicht in der Probenflüssigkeit, sondern in den sie umgebenden Baugruppen verbraucht wird.

Des Weiteren ist aus US-PS 5,270,183 ein im Durchflußprinzip arbeitender Thermocycler bekannt geworden, bei dem die zu amplifizierende Probenflüssigkeit durch eine Rohrleitung geschickt wird, welche nacheinander um mehrere, auf unterschiedlichen Temperaturen gehaltene Zylinder ein oder mehrfach aufgewickelt ist. Grundsätzlich sind mit einer solchen Ausbildung auch relativ kleine Probenmengen, bis herunter zu ca. 25 µl, amplifizierbar. Eine derartige Vorrichtung ist in ihrer Handhabung jedoch recht unpraktikabel und erfordert eine hohe Kunstfertigkeit vom Gerätehersteller, so daß sie für eine Serienfertigung gänzlich ungeeignet ist.

Vorliegender Erfindung am nächsten kommt ein in WO 96/10456 beschriebener Fluß-Thermocycler, bei dem aus der sogenannten Mikrosystemtechnik bekannte Strukturierungstechnologien angewendet werden, um eine Probenaufnahmekammer zu schaffen, die eine dynamische Probenbehandlung auch sehr kleiner Mengen, z.T. sehr

teurer Materialien, ermöglicht. Durch diesen Vorschlag wird erreicht, daß die in jeweils vorgesehenen Heiz- und Kühlzonen gerade einer Behandlung unterworfenen Probenteilvolumina einen homogenen Temperaturdurchsatz erfahren, was ebenfalls eine Ausbeuteerhöhung der zu amplifizierenden Substanz bewirkt. Weiterhin wird durch den anordnungsbedingten Wegfall von Heiz- und Kühlprozessen der Wandungsmaterialien und die drastische Minimierung parasitärer Wärmekapazitäten und Wärmeeinflüsse nicht nur ein erheblich geringerer Steuer- und Regelaufwand erforderlich, sondern der Gesamtprozeß-  
5 durchlauf erfährt auch eine wesentliche Zeitverkürzung. Dabei braucht jeweils nur soviel Heiz- und Kühlleistung eingespeist zu werden, wie im Probenflüssigkeitsstrom transportiert wird. Darüber hinaus ermöglicht die in WO 96/10456 Thermocyclerausbildung nicht nur eine kontinuierliche Prozeßführung, sondern auch einen seriellen Betrieb, indem unterschiedliche 10 Substanzen nacheinander dem Thermocycler zuführbar sind, ohne daß es zu störenden Vermischungen mit der noch in der Anordnung befindlichen Probe kommen würde. Dieser Lösung haftet jedoch der Nachteil an, daß sie zum einen, einen äußerst präzisen Strukturierungsprozeß zur Herstellung dort vorgesehener Membranen 15 erfordert, zum anderen kommt es durch den Aufbau der dort beschriebenen Vorrichtung zumindest bei Teildurchläufen zu einer unerwünscht hohen Verweildauer der Probenflüssigkeit in den Kühlzonenbereichen, was bei Durchführung einer PCR zur Bildung 20 unerwünschter Nebenprodukte führen kann.

25 Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, einen miniaturisierten Temperaturzonen Flußreaktor anzugeben, der thermisch kontrollierte, biochemische bzw. molekularbiologische Prozesse, insbesondere das Verfahren der Polymerase-Ketten-Reaktion, effektiver als nach dem 30 Stand der Technik durchführen läßt.

Die Aufgabe wird durch die kennzeichnenden Merkmale des ersten Patentanspruchs gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen sind durch die nachgeordneten Ansprüche erfaßt.  
35 Durch die Erfindung wird ein zirkuläres Erwärmen und Abkühlen von Lösungen auf unterschiedliche Temperaturstufen im kontinuierlichen

Fluß auf engstem Raum (im Mikrometer-Bereich) realisiert, um z.B. drei Reaktionen, z.B. Denaturierung, Annealing und Extension an DNS, in einer Probe, und insbesondere in mehreren unterschiedlichen Proben, die von einem Trägermedium in sequentiellen Abschnitten durch einen geschlossenen Durchflußweg transportiert werden, wiederholt und unter Beibehaltung der Reihenfolge und identischer Probenbehandlung durchführen zu können. Dabei können verschiedene Proben hintereinander injiziert werden, ohne miteinander zu vermischen, und anschließend geordnet in Probenkammern, mit Hilfe der vorgeschlagenen Vorrichtung auch parallel abgelegt werden.

Die Erfindung sieht vor, drei mit Gräben versehene mikrostrukturierte Chips, die aus einem gut wärmeleitfähigen Material bestehen, um einen schlecht wärmeleitfähigen Verbindungschip derart anzuordnen, daß wenigstens ein geschlossener Durchflußweg durch alle Chips gebildet wird. Jeder der Mikrochips wird mit einer vorgebbaren und voneinander unterschiedlichen Temperatur beaufschlagt. Die Zu- und Abflußmündungen der gut wärmeleitfähigen Chips sind von Durchlaßöffnungen des Verbindungschip derart erfaßt, daß die Probenflüssigkeit von A nach B nach C und wieder nach A nach B nach C gelangt, wobei der Prozeß n-mal wiederholbar ist, wobei n für die Anzahl der im Eingangs- (A) und Ausgangschip (C) vorgesehenen Grabenabschnitten steht. Die auf der jeweils gewünschten Temperatur gehaltenen Chips sind dabei alternierend um den Verbindungschip angeordnet, so daß die unterschiedlichen Temperaturzonen thermisch voneinander isoliert sind. Innerhalb eines jeden Chips gleicher Temperaturzone führt dessen höhere Wärmeleitfähigkeit zu einer homogenen Temperaturverteilung der ihn durchlaufenden Flüssigkeit. Weiterhin sind auf den Chips Heizer- und Fühlerstrukturen in Dünnschichttechnologie integriert. Eine externe Kühlung kann sich auf die kälteste Zone beschränken. Dazu ist bspw. ein Kühlblock, bspw. versehen mit in Dünnschichttechnik ausführbaren Peltierelementen, auf die Oberfläche des kältesten Chips (B) vorgesehen. Alternativ ist auch die Kühlung mit einem Luftstrom möglich.

Weiterhin ist der gekühlte Chip B mit Rückführungskanälen versehen, die bspw. im Querschnitt derart klein ausgeführt sind, daß die Verweildauer

der Probe während der Rückführung vom Chip C nach Chip A im Chip B minimiert ist. Dadurch reicht die Zeit nicht, um die Probe während der Rückführung in den Chip A auf die Temperatur des Chips B zu bringen; sie behält weitgehend die Temperatur des Chips C bei. Die Rückführungskanäle können zudem vom Chip B zusätzlich thermisch isoliert sein.

Die Verwendung eines optisch transparenten Materials, z.B. Pyrexglas, für den Verbindungschip erlaubt eine optische *in situ* Detektion von Reaktionspartnern in der Probe über eine Fluoreszenzdetektion eines zugegebenen Farbstoffs, was insbesondere für Analysezwecke sehr interessant ist.

In den erfindungsgemäßen miniaturisierten Temperaturzonen Flußreaktor werden die einzelnen Proben als Tropfen nacheinander in einen kontinuierlichen Trägerflüssigkeitsstrom injiziert, der durch den miniaturisierten Temperaturzonen Flußreaktor gepumpt wird. Für die Trägerflüssigkeit wurde eine solche ausgewählt, die sich nicht mit der Probenflüssigkeit vermischt; dadurch können unterschiedliche Proben nacheinander verarbeitet werden. Durch Aufhängen des vorgeschlagenen Temperaturzonen Flußreaktors an eine xy-Verschiebeeinheit kann die serielle Abgabe der Probenflüssigkeiten in eine parallele zweidimensionale Anordnung, z.B. eine Nanotiterplatte oder ein Elektrophoresegel, überführt werden. Dabei wird der Reaktor nach dem Befüllen einer Kammer mit einem Probentropfen zur nächsten Kammer weitergeschoben. Der Austritt eines Tropfens kann durch die Brechung eines Lichtstahls an dem Probentropfen in der Trägerflüssigkeit mittels eines Fotometermoduls detektiert werden. Sind auf dem vorgeschlagenen Temperaturzonen Flußreaktor mehrere, voneinander getrennte Durchflußwege vorgesehen oder werden mehrere miniaturisierte Temperaturzonen Flußreaktoren nebeneinander in der vorstehend beschriebenen Weise betrieben, ist die genannte serielle Probenüberführung in eine parallele Anordnung in sehr effizienter Weise realisierbar.

Die Erfindung soll nachstehend anhand eines schematischen Ausführungsbeispiels näher erläutert werden. Es zeigen:

Fig. 1 in Explosionsdarstellung eine Ausführungsmöglichkeit eines miniaturisierten Temperaturzonen Flußreaktors nach der Erfindung und

5 Fig. 2 ein Fotometersignal am Ausgang des miniaturisierten Temperaturzonen Flußreaktors, das verdeutlicht, daß es zu keiner Vermischung einzelner Probenbereiche während des Durchflusses kommt.

10 In Figur 1 ist in Explosionsdarstellung ein miniaturisierter Temperaturzonen Flußreaktor dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist im Beispiel nur ein geschlossener Durchflußweg dargestellt, dessen Laufweg nachfolgend beschrieben wird. Zunächst ist ein erstes Substratplättchen A vorgesehen, das im Beispiel eine äußere Bemaßung (Länge, Breite, Dicke) von  $(8 \cdot 13 \cdot 0,5)$  mm aufweist und in das einseitig Gräben eingebracht sind, die eine Länge von 9 mm, eine Breite von 0,536 mm und eine Tiefe von 0,380 mm aufweisen sollen. Unter der hier bezeichneten Länge ist im Beispiel der gesamte Einzelkanalabschnitt zu verstehen, der bspw. zwischen einer 15 Zuflußmündung az2 und der zugehörigen Abflußmündung aa2 eingenommen wird, wodurch dieser Kanalabschnitt im Beispiel ein Volumen von  $0,9 \mu\text{l}$  aufzunehmen vermag. Weiterhin ist ein drittes Substratplättchen C vorgesehen, das im Beispiel eine äußere Bemaßung (Länge, Breite, Dicke) von  $(14 \cdot 13 \cdot 0,5)$  mm aufweist und in das einseitig Gräben eingebracht sind, die eine Länge von 22 mm, eine Breite von 0,536 mm und eine Tiefe von 0,380 mm aufweisen sollen, so daß 20 dieser Einzelkanalabschnitt ein Volumen von  $2,26 \mu\text{l}$  aufzunehmen vermag. Bezuglich der hier unter Länge zu verstehenden Größe ist eine ebensolche zu verstehen, wie zum ersten Substratplättchen A ausgeführt. 25 Beide genannten Substratplättchen A, C bestehen aus einem gut wärmeleitfähigem Material, im Beispiel aus Silizium, und sind auf der den geöffneten Grabenseiten gegenüberliegenden Seite ganzflächig von mit regelbarer, variierbarer Temperatur beabschlagbaren Heizmitteln H erfaßt. Im Beispiel sind diese Heizmittel H durch mäandriert ausgebildete 30 und direkt auf die Substratplättchen aufgebracht Dünnschichtheizelemente gebildet. Weiterhin sind auf diesen Substraten 35

Dünnenschichttemperaturfühler F integriert angebracht, die zur Steuerung und Regelung der jeweils einzustellenden Temperatur Verwendung finden.

Die Zu- und Abflußmündungen az1...aa4 des ersten Substratplättchens A 5 und die Zu- und Abflußmündungen cz1...ca4 des dritten Substratplättchens C sind einseitig im wesentlichen in einer Linie nebeneinander auf einer Teilseite des jeweiligen Substratplättchens angeordnet und voneinander beabstandet mit der Fläche, die den Heizmitteln H gegenüberliegt, auf einer ersten Seite V1 eines schlecht 10 wärmeleitfähigen und über ein mit Durchlaßöffnungen Vd versehenen Verbindungschip V, für den im Beispiel ein 1,1 mm dicker Pyrexglaschip eingesetzt ist, aufgebracht und mit diesem durch anodisches Bonden derart verbunden, daß genannte Zu- und Abflußmündungen und von den Durchlaßöffnungen Vd erfaßt sind.

15 Die rückseitige Verbindung der Teilwege A1...An und der Teilwege C1...Cn erfolgt durch ein auf der zweiten Seite V2 des Verbindungschips V angebondetes zweites Substratplättchen B, für welches im Beispiel ebenfalls ein Siliziumchip mit den Maßen (12 · 10 · 0,5) mm verwendet ist, in den sich längs erstreckende Gräben einer Länge von 9 mm, einer Breite von 0,536 mm und einer Tiefe von 0,38 mm eingebracht sind. 20 Diese n Kanäle, im Beispiel vier: B1...B4, übernehmen jeweils den strömenden Fluß von A nach C. Weiterhin sind zwischen diesen Kanälen B1...B4 jeweils zwischenliegend n-1 Kanäle, im Beispiel drei: BB1...BB3, vorgesehen, die den rückströmenden Fluß von C nach A übernehmen. Die rückführenden Kanäle sind dabei so ausgebildet, daß sie zunächst durch Gräben gebildet sind, daß sie eine Länge von 9 mm, eine Breite von 0,26 mm und einer Tiefe von 0,184 mm aufweisen und somit ein Volumen von 0,2 µl aufzunehmen vermögen, wohingegen die hinführenden Kanäle B1...B4 ein Volumen von 0,9 µl aufnehmen. 25 Weiterhin ist es im Rahmen der Erfindung vorteilhaft, die rückführenden Kanäle BB1...BB3 des Substratplättchens B mit einer thermisch isolierenden Auskleidung gegenüber dem Wandungsmaterial des Substratplättchens B zu versehen. Dies kann im zusammengebauten Zustand des Temperaturzonen Flußreaktors durch Durchleitung und 30 wandungsmäßiger Anlagerung eines Polymers vorgenommen werden. In jedem Fall soll den rückführenden Kanälen ein verringelter

35

Strömungsquerschnitt derart gegeben sein, daß die Durchflußgeschwindigkeit durch die rückführenden Gräben (BB1...BBn-1) gegenüber der durch die Gräben (B1...Bn) wenigstens um ein 3faches erhöht ist. Durch die im Beispiel beschriebene Aufteilung des einen geschlossenen Durchflußwegs in drei Teilwege A1...A4, B1...B4, BB1...BB3 und C1...C4 und die entsprechend angepaßten Bemaßungen der Grabenabschnitte innerhalb der jeweiligen Substratplättchen erreicht man, bei einer anliegenden Durchflußgeschwindigkeit von 1  $\mu$ l/min, Verweilzeiten der einzelnen Proben in den jeweiligen Kanalbereichen der Substratplättchen A, B, C und damit entsprechend der dort vorgegebenen Temperaturen pro Durchgang durch den jeweiligen Teilabschnitt Einwirkzeiten wie folgt: Zone A = 55 s Zone B = 55 s im hinführenden Kanal und Zone C = 140 s im rückführenden Kanalzone C = 140 s. Da die Durchflußgeschwindigkeit in den rückführenden Kanälen BB1...BB3 wesentlich erhöht ist und die Kanäle, wie oben ausgeführt, vorzugsweise gegenüber dem Material des Substratplättchens B zusätzlich thermisch isoliert sind, sinkt die Probentemperatur beim Rücklauf nur unerheblich unter die, die sie im Bereich C angenommen hat. Ansonsten wird das Substratplättchen B einer externen Kühlung durch Kontaktierung an einen Kühlblock K, oder durch in Dünnschichttechnik aufgebrachte Peltierelemente, auf der erforderlichen Temperatur gehalten. Alternativ ist auch die Kühlung in einem Luftstrom möglich.

Dadurch, daß der Verbindungschip (V) aus einem optisch transparenten Material, z.B. Pyrexglas, gebildet ist und gemäß der Anordnung der Substratplättchen A, C zwischen diesen ein zugänglicher Freiraum verbleibt, ist die Möglichkeit einer optischen *in situ* Detektion von Reaktionspartnern in der Probe über eine Fluoreszenzdetektion eines zugegebenen Farbstoffs gegeben, was insbesondere für Analysezwecke äußerst vorteilhaft ist.

Für die Durchführung einer PCR sind im Beispiel die drei Temperaturzonen so ausgelegt, daß im Bereich des Substratplättchens A die Denaturierung einer doppelsträngige DNS durchgeführt werden kann, daß im Bereich des Substratplättchens B die Anlagerung von Primern an einzelsträngiger DNS ermöglicht ist (Annealing), und daß im Bereich des Substratplättchens C mittels TAQ-Polymerase die Primer-Extension ermöglicht ist. Die im Ausführungsbeispiel gemessenen Temperaturen

betrugen: Zone A: 95°C; Zone B: 55°C; Zone C: 72°C. Durch Anschluß eines externen Proportionalreglers kann die Temperatur in den Zonen auf 1°C konstant gehalten werden. Die Trägerflüssigkeit durchläuft in der beschriebenen Ausführung 4mal jede der genannten Zonen. Weiterhin 5 sind der erste Zuflußweg, gebildet durch den Teilweg az1 bis aal im ersten Substratplättchen A und der letzte Abflußweg, gebildet durch den Teilweg cz4 bis ca4 im dritten Substratplättchen B gegenüber den sonstigen, auf den jeweiligen Substratplättchen vorgesehenen n Teilgräben verlängert ausgeführt, um den Prozessen am Ein- und 10 Ausgang des vorgeschlagenen Temperaturzonen Flußreaktors eine längere Reaktionszeit für die PCR einzuräumen.

Am Auslaß, hier ca4, ist mittels eines nicht dargestellten Fotometermoduls eine Segmentierung der Probenflüssigkeit und der Einsatz des miniaturisierten Temperaturzonen Flußreaktors, entweder 15 durch mehrfachen parallelen Einsatz des zu Fig. 1 beschriebenen Temperaturzonen Flußreaktors oder durch Vorsehen mehrerer geschlossener und gemäß der Erfindung in drei Zonen unterteilter Durchflußwege auf jeweils einer der Substratplättchen A, B, C zur Übergabe und parallelen Probenabgabe, wie oben beschrieben, ermöglicht. 20

In Figur 2 ist beispielhaft das Signal eines solchen Fotometers am Ausgang des miniaturisierten Temperaturzonen Flußreaktors dargestellt, das verdeutlicht, daß es zu keiner Vermischung einzelner Probenbereiche während des Durchflusses kommt, wenn als Trägermedium für den 25 Probentransport eine mit dem Proben nichtmischbare Flüssigkeit, insbesondere ein Öl, eingesetzt ist. Zur Testung wurde dabei eine eingefärbte Probe verwendet.

Patentansprüche

1. Miniaturisierter Temperaturzonen Flußreaktor, beinhaltend wenigstens  
5 einen mehrfach gewundenen Durchflußweg, der durch mikrostrukturierte Ausnehmungen in einem ebenen Substrat gebildet ist, dadurch gekennzeichnet, daß jeder der einen geschlossenen Durchflußweg bildenden Durchflußwege in wenigstens drei Teilwege (A1...An; B1...Bn und BB1...BBn-1; C1...Cn) derart unterteilt ist, daß  
10 drei Substratplättchen (A; B; C), bestehend aus einem Material mit einer möglichst hohen Wärmeleitfähigkeit, vorgesehen sind, wobei die Substratplättchen auf einer Flächenseite vollständig, zumindest über den in den Substratplättchen vorgesehenen Grabenbereichen, flächig von mit regelbarer, variierbarer Temperatur beaufschlagbaren Heizmitteln (H) erfaßt sind,  
15 das erste Substratplättchen (A) mit Einlässen (az1), deren Anzahl der Anzahl der vorgesehenen Durchflußwege entspricht, versehen ist und das dritte Substratplättchen (C) mit Auslässen (ca4), deren Anzahl der Anzahl der vorgesehenen Durchflußwege entspricht, versehen ist und genannte Substratplättchen (A; C) jeweils mit n Grabenabschnitten  
20 versehen sind, jeder der n Grabenabschnitte jeweils eine Zu- und Abflußmündung (az1...aa4; cz1...ca4) aufweist, welche einseitig im wesentlichen in einer Linie nebeneinander auf einer Teilseite des jeweiligen Substratplättchens angeordnet sind,  
25 das erste Substratplättchen (A) und dritte Substratplättchen (C) voneinander beabstandet mit der Fläche, die den Heizmitteln (H) gegenüberliegt, auf einer ersten Seite (V1) eines schlecht wärmeleitfähigen und über ein mit Durchlaßöffnungen (Vd) versehenen Verbindungsrippe (V) aufgebracht und mit diesem derart verbunden sind, daß genannte Zu- und Abflußmündungen (aa1...aa4; cz1...cz4) von den Durchlaßöffnungen (Vd) erfaßt sind und die Durchlaßöffnungen auf der zweiten Seite des Verbindungsrippe (V2)  
30 über mikrostrukturierte Gräben, die die Teilwege (B1...Bn und BB1...BBn-1) des zweiten Substratplättchens (B) bilden, miteinander verbunden sind, wodurch jeweils ein geschlossener Durchflußweg mit n Durchläufen durch die Substratplättchen (A; B; C) gebildet ist.  
35

2. Miniaturisierter Temperaturzonen Flußreaktor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß von den Teilwegen (B1...Bn und BB1...BBn-1) des zweiten Substratplättchens (B) jeweils den rückführenden Gräben (BB1...BBn-1) ein gegenüber den restlichen n Gräben (B1...Bn) verringelter Strömungsquerschnitt derart gegeben ist, daß die Durchflußgeschwindigkeit durch die rückführenden Gräben (BB1...BBn-1) gegenüber der Durchflußgeschwindigkeit durch die restlichen Gräben (B1...Bn) wenigstens um ein 3faches erhöht ist.  
5
- 10 3. Miniaturisierter Temperaturzonen Flußreaktor nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die durch die rückführenden Gräben (BB1...BBn-1) gebildeten Kanäle mit einer thermisch gegen das Substratplättchen (B) isolierenden Auskleidung versehen sind.
- 15 4. Miniaturisierter Temperaturzonen Flußreaktor nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die thermisch isolierende Auskleidung durch ein Polymer gebildet ist.
- 20 5. Miniaturisierter Temperaturzonen Flußreaktor nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Verbindungschip (V) aus einem optisch transparenten Material gebildet ist.
- 25 6. Miniaturisierter Temperaturzonen Flußreaktor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der erste Zuflußweg (az1 bis aa1) im ersten Substratplättchen (A) und der letzte Abflußweg (cz4 bis ca4) im dritten Substratplättchen (B) gegenüber den sonstigen, auf den jeweiligen Substratplättchen vorgesehenen n Teilgräben verlängert ausgeführt sind.  
30 7. Miniaturisierter Temperaturzonen Flußreaktor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Trägermedium für den Probentransport eine mit dem Proben nichtmischbare Flüssigkeit, insbesondere ein Öl, eingesetzt ist.

- 12 -

8. Miniaturisierter Temperaturzonen Flußreaktor nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, daß das zweite Substratplättchen (B) einseitig  
von einem flächigen Kühlmittel (K), zur Erzeugung einer gegenüber  
den durch die sonstigen Substratplättchen (A, B) abgesenkten  
Temperatur, erfaßt ist.

5

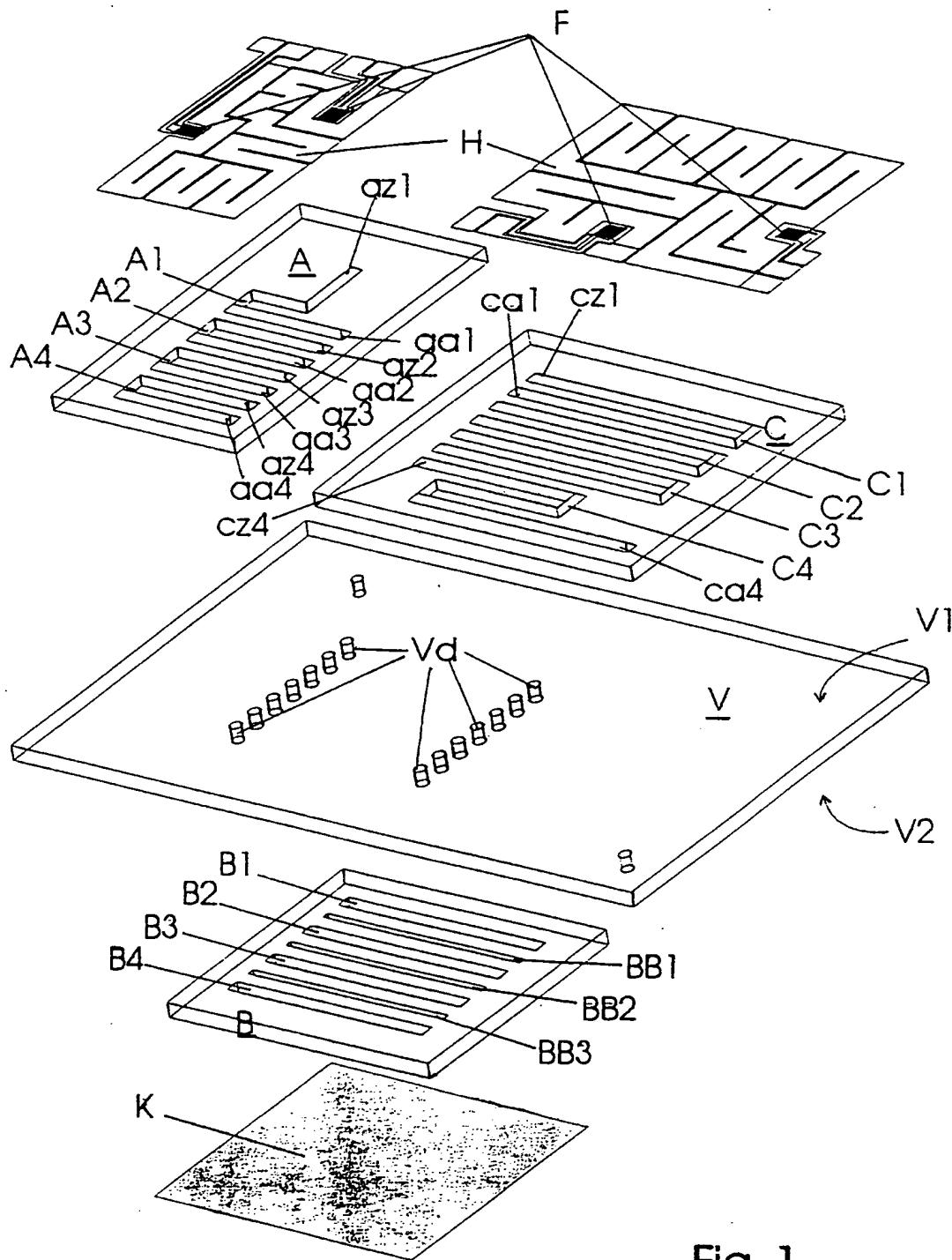


Fig. 1

2 / 2

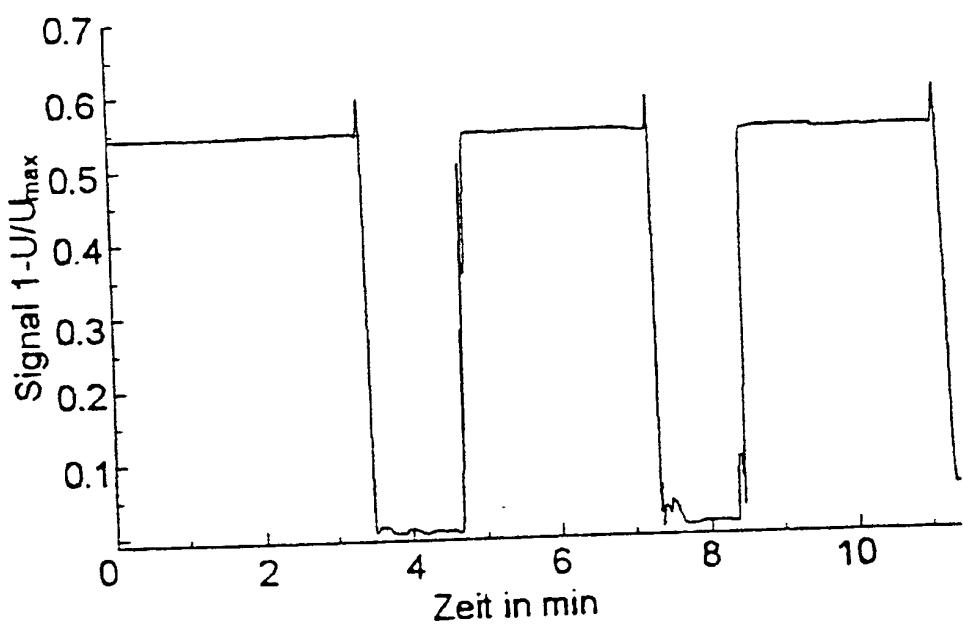


Fig. 2

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. ional Application No  
PCT/EP 99/01014

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 6 B01L7/00 C1201/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 B01L B01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 44 35 107 C (BIOMETRA BIOMEDIZINISCHE ANALY ;INST PHYSIKALISCHE HOCHTECHNOL (DE) 4 April 1996 cited in the application see column 3, line 62 - column 4, line 8 see column 2, line 43 - line 53	1
A	WO 92 13967 A (BECKMAN RES INST CITY HOPE ;CORBETT JOHN MICHAEL (AU); REED KENNETH) 20 August 1992 cited in the application see page 16, line 27 - line 32	7
A	WO 94 21372 A (DU PONT) 29 September 1994 see page 7, line 15 - page 8, line 10 see page 22, line 21 - line 35; figure 9	1
	-/-	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 July 1999

Date of mailing of the international search report

09/07/1999

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hocquet, A

2

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Inte	onal Application No
PCT/EP 99/01014	

**C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	WO 97 14497 A (BATTELLE MEMORIAL INSTITUTE) 24 April 1997 see page 7, line 15 - line 18 see page 15, line 20 - line 26; figure 7C see page 16, line 11 - page 17, line 3 -----	1
2		

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

## Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/01014

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)			Publication date
DE 4435107	C	04-04-1996	WO 9610456 A		11-04-1996
			EP 0731732 A		18-09-1996
			US 5716842 A		10-02-1998
-----					
WO 9213967	A	20-08-1992	US 5270183 A		14-12-1993
			AU 660652 B		06-07-1995
			AU 1185092 A		07-09-1992
-----					
WO 9421372	A	29-09-1994	US 5534328 A		09-07-1996
			AU 6409794 A		11-10-1994
			BR 9405989 A		26-12-1995
			DE 69413012 D		08-10-1998
			DE 69413012 T		25-03-1999
			EP 0688242 A		27-12-1995
			JP 8508197 T		03-09-1996
			US 5690763 A		25-11-1997
-----					
WO 9714497	A	24-04-1997	US 5811062 A		22-09-1998
			AU 1073497 A		07-05-1997
			EP 0862493 A		09-09-1998
-----					

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/01014

A. KLASSEFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 B01L7/00 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestpräststoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 B01L B01J

Recherchierte aber nicht zum Mindestpräststoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr
A	DE 44 35 107 C (BIOMETRA BIOMEDIZINISCHE ANALY ;INST PHYSIKALISCHE HOCHTECHNOL (DE) 4. April 1996 in der Anmeldung erwähnt siehe Spalte 3, Zeile 62 - Spalte 4, Zeile 8	1
A	siehe Spalte 2, Zeile 43 - Zeile 53 ---	7
A	WO 92 13967 A (BECKMAN RES INST CITY HOPE ;CORBETT JOHN MICHAEL (AU); REED KENNETH) 20. August 1992 in der Anmeldung erwähnt	1
A	siehe Seite 16, Zeile 27 - Zeile 32 ---	7
		-/-



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

- ' Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen
- 'A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- 'E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- 'L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- 'O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- 'P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

2. Juli 1999

09/07/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P. B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040 Tx 31 651 epo m  
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hocquet, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. nales Aktenzeichen

PCT/EP 99/01014

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 94 21372 A (DU PONT) 29. September 1994 siehe Seite 7, Zeile 15 – Seite 8, Zeile 10 siehe Seite 22, Zeile 21 – Zeile 35: Abbildung 9 -----	1
A	WO 97 14497 A (BATTELLE MEMORIAL INSTITUTE) 24. April 1997 siehe Seite 7, Zeile 15 – Zeile 18 siehe Seite 15, Zeile 20 – Zeile 26; Abbildung 7C siehe Seite 16, Zeile 11 – Seite 17, Zeile 3 -----	1

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/01014

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DE 4435107 C	04-04-1996	WO	9610456 A	11-04-1996
		EP	0731732 A	18-09-1996
		US	5716842 A	10-02-1998
-----				
WO 9213967 A	20-08-1992	US	5270183 A	14-12-1993
		AU	660652 B	06-07-1995
		AU	1185092 A	07-09-1992
-----				
WO 9421372 A	29-09-1994	US	5534328 A	09-07-1996
		AU	6409794 A	11-10-1994
		BR	9405989 A	26-12-1995
		DE	69413012 D	08-10-1998
		DE	69413012 T	25-03-1999
		EP	0688242 A	27-12-1995
		JP	8508197 T	03-09-1996
		US	5690763 A	25-11-1997
-----				
WO 9714497 A	24-04-1997	US	5811062 A	22-09-1998
		AU	1073497 A	07-05-1997
		EP	0862493 A	09-09-1998
-----				